

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-203998

(43)Date of publication of application : 08.08.1995

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68

C12N 15/09

C12Q 1/66

G01N 21/78

G01N 33/50

(21)Application number : 06-006971

(71)Applicant : HAMAMATSU PHOTONICS KK

(22)Date of filing : 26.01.1994

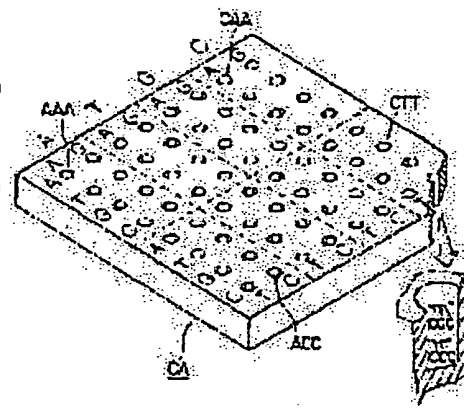
(72)Inventor :  
HOSOI SHIGERU  
FUKAMI TADASHI  
HIYOSHI MAKIKO

## (54) METHOD FOR DETERMINING NUCLEIC ACID BASE SEQUENCE

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To provide a method enabling the determination of the base sequence of a nucleic acid in a short time.

**CONSTITUTION:** An oligonucleotide containing all (k) base sequences as a primer is fixed in each column. An unknown single strand nucleic acid to be examined is added to each column of a capillary plate CA containing the primer in each column to effect the hybridization of the primer with the specimen nucleic acid in each column. Each column is incorporated with 4 kinds of dNTP together with a DNA polymerase as a catalyst. A base complementary to each base of the specimen nucleic acid hybridizes with the base of the specimen nucleic acid from the 5' to the 3' direction of the primer to cause an extension reaction of the primer in one direction. The extension length is measured to identify the bonded primer and the bonding position of the primer and the specimen nucleic acid.



### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-203998

(43) 公開日 平成7年(1995)8月8日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		A 9453-4B		
C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 Q 1/66		6807-4B		
G 0 1 N 21/78	C			
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 13 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-6971

(22) 出願日 平成6年(1994)1月26日

(71) 出願人 000236436

浜松ホトニクス株式会社

静岡県浜松市市野町1126番地の1

(72) 発明者 細井 茂

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ  
トニクス株式会社内

(72) 発明者 深見 正

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ  
トニクス株式会社内

(72) 発明者 日吉 牧子

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ  
トニクス株式会社内

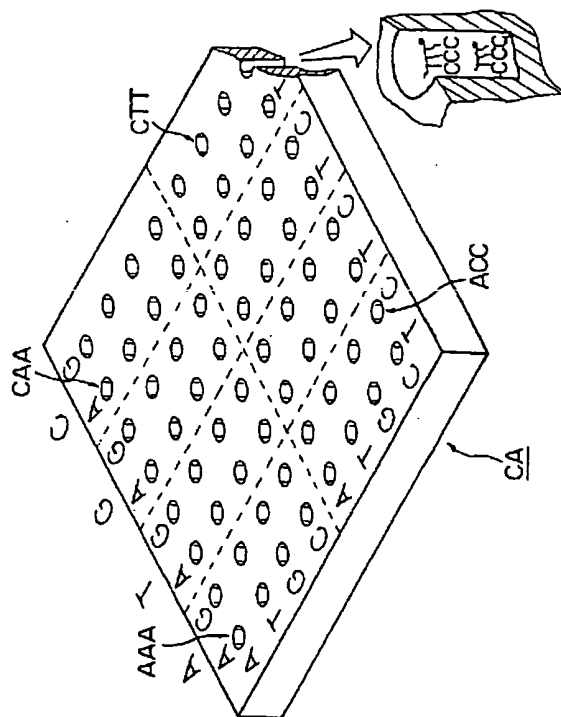
(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外4名)

(54) 【発明の名称】 核酸塩基配列決定方法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 短時間に核酸の塩基配列が決定可能な核酸塩基配列決定方法を提供する。

【構成】 プライマーとして全てのk塩基の配列を含むオリゴヌクレオチドを各コラム内に固定する。そして、このようにしてプライマーが各コラム内に固定されたキャピラリープレートCAの各コラム内に未知の一本鎖被検核酸を加えて各コラム内のプライマーと被検核酸とをハイブリダイズさせた後各コラムに4種類のdNTPをDNAポリメラーゼを触媒として同時に加える。これにより、プライマーの5'から3'方向には、被検核酸の各塩基に相補的な塩基が被検核酸の塩基とハイブリダイズし、プライマーの一方方向伸張反応が生じる。この伸張量を測定することにより、結合したプライマーおよびプライマーと被検核酸との結合位置を同定する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 一重鎖の被検核酸の塩基配列決定方法において、複数の領域に種類ごとに分離して配置されたプライマー（オリゴヌクレオチド）と一重鎖の被検核酸とをハイブリダイゼーションさせて鋳型・プライマーの二重鎖部分を有する複合体を形成する第1の工程と、前記複数の領域に配置されたそれぞれの前記複合体に、前記複合体の鋳型のヌクレオチドに相補的で塩基対合しうる複数種類のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を実質的に同時に加えて、前記被検核酸を鋳型にしたプライマーの5'から3'方向への伸張反応を行う第2の工程と、前記プライマーの伸張した量を検出する第3の工程と、を含むことを特徴とする核酸塩基配列決定方法。

【請求項2】 前記複数の領域がガラス製もしくはシリコン製の材料から構成されるキャピラリープレートのコラムによって規定される、ことを特徴とする請求項1に記載の核酸塩基配列決定方法。

【請求項3】 前記第3の工程におけるプライマーの伸張量を、前記第2の工程における伸張反応に伴って前記複数種類のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体から遊離したピロリン酸をAPSと反応させてATPを生成し、このATPのルシフェラーゼ反応に伴う発光量を検出することにより行う、ことを特徴とする請求項1に記載の核酸塩基配列決定方法。

【請求項4】 前記第2の工程において複数種類のヌクレオチド類似体として蛍光ラベルしたデオキシリボヌクレオチド三リン酸（dNTP）を加えて被検核酸を鋳型にしたプライマーの伸張反応を行い、前記第3の工程におけるプライマーの伸張量を、前記複数の領域に励起光を照射して、伸張したプライマーの蛍光ラベルからの発光量を検出することにより行う、ことを特徴とする請求項1に記載の核酸塩基配列決定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生体内の核酸を物理的および化学的な手法により分析することにより、生体の遺伝子情報を得ることが可能な核酸塩基配列決定方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】DNAの塩基配列はSangerらのジデオキシチエンターミネーター法（Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977）及びMaxam-Gilbertの化学分解法（Maxam, A. M. and Gilbert, W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560-564, 1977）の2つが実用化されている。いずれも被検DNAのいろいろの長さの断片の末端塩基の種類

が同定できるように放射性同位元素や蛍光色素等でラベルされるようにして合成もしくは分解した後、ゲル電気泳動することにより、各断片を短い順に分離し短い方から順番に末端の塩基の種類を読み取って行くことにより配列を推測する。これらの方法は改良されて現在に至っているが、いずれも電気泳動によって分離しているので多大の時間と労力を要していた。人の全ゲノム（約30億塩基配列）等のように大規模な塩基配列を決定するためにはより効率の良い新しい方法が求められている。

【0003】このような新しい方法の1つとしてsequencing by hybridization (SBH) 法とよばれるものが提唱されている（Bains, Wand Smith, G. C. J. Theor. Biol. 135: 303-307, 1988; Darnace, R., Labat, I., Brunker, I. and Crkvenjakov, R., Genomics 4: 114-128, 1989）。

【0004】この方法の基本は、被検DNAの塩基配列をその中に含まれている長さk塩基の全てのオリゴヌクレオチドの組成F<sup>k</sup>から整列決定することにある。整列決定のアルゴリズムはよくパズルで見かける図形の一筆書きの問題に帰着される（Pevzner, P. A. J. Biomol. Struct. Dyn. 7: 63-73, 1989）。Pevznerら（1991）は、長さk塩基のオリゴヌクレオチド組成を基に95%の確率で決定できるDNAの長さをシュミレーションにより求めている（Pevzner, P. A., Lysov, Y. P., Khrapko, K. R. Belyavskii, A. V., Florentev, V. L. and Mirzabekov, A., J. Biomol. Struct. Dyn. 9: 399-419, 1991）。例えば、65536通りある長さ8塩基のオリゴヌクレオチドを用いると、図10に示すように、約180塩基のDNA塩基配列を整列決定できる。実際の決定法では、被検核酸の一本鎖をk塩基のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション（交雑）により組成F<sup>k</sup>を見出す。従って8塩基の場合、被検核酸で塩基数が約180を越える被検核酸を交雑させることはできない。また、この場合、オリゴヌクレオチドは65536通りもあるので、実用的な装置を構成するためには、オリゴヌクレオチドもしくは被検核酸を計測器にセットできる程度の大きさのマトリックス状に固定する必要がある（この方法は、sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix (SHOM) 法と呼ばれる。）

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、以上説明したSBH/SHOM法には2つの大きな問題点があることが指摘されている（陶山 明 蛋白質核酸酵素, 38: 647-657, 1993）。1つは不完全交

雑、部分交雑によるミスマッチの問題である。完全に相補的でなくても部分的に相補的であれば、オリゴヌクレオチドは被検核酸と交雑することが可能であり、本来被検核酸に含まれない配列まで整列計算に含めてしまう可能性がある。もう1つは、繰り返し配列（又は同じヌクレオチド配列）の問題である。もしも被検核酸に同じヌクレオチド配列が複数含まれている場合には、交雑を検出するだけではその塩基配列が含まれているという事は分かるが、計算アルゴリズムによる整列だけで繰り返し塩基配列のそれぞれの位置を決定することは極めて困難になる。

【0006】さらに、繰り返し配列はないがSBH法ではこの塩基配列を一義的に決定することが不可能な場合もある。以下に簡単な例を示す。

【0007】まず、被検核酸は[ATGAT]であるとする。この場合において、3merのプライマーがハイブリダイズするとすると、この被検核酸の部分配列は、[ATG]、[TGA]、[GAT]の3つであることになる。しかし、この3つの部分配列を整列させることにより元の配列を決定しようとする、被検核酸の塩基配列には、

(場合1)

ATG  
TGA  
GAT

と、

(場合2)

GAT  
ATG  
TGA

の2通りの場合が考えられる。よって、SBH法では一義的に核酸塩基の配列を決定できないこととなる。

【0008】そして、SBH/SHOM法は、これらの方法以前の配列決定方法よりも格段に処理時間が短縮されているが、遺伝子解析においてはさらに短時間でこれら核酸の塩基配列を決定できることが望まれる。

【0009】本発明は、このような問題に鑑みてなされたものであり、迅速に核酸の塩基配列を決定することが可能な核酸塩基配列決定法を提供することを主たる目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】以上の問題を解決するため、本発明は、一重鎖の核酸塩基配列決定方法を対象とするものであり、一重鎖の被検核酸の塩基配列決定方法において、複数の領域に種類ごとに分離して配置されたプライマー（オリゴヌクレオチド）と一重鎖の被検核酸とをハイブリダイゼーションさせて鋳型・プライマーの二重鎖部分を有する複合体を形成する第1の工程と、複数の領域に配置されたそれぞれの複合体に、複合体の鋳型のヌクレオチドに相補的に塩基対合しうる複数種類の

ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を実質的に同時に加えて、被検核酸を鋳型にしたプライマーの5'から3'方向への伸張反応を行う第2の工程と、プライマーの伸張した量を検出する第3の工程とを含むこととした。

【0011】

【作用】このように本発明に係る核酸塩基配列決定方法によれば、まず、第1の工程により、複数の領域に種類ごとに分離して配置されたプライマーと被検核酸とをハイブリダイゼーションさせてこれらの複合体を形成し、次に、第2の工程により被検核酸を鋳型としてこれに對合しうるヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を実質的に同時に加えて、一度に被検核酸を鋳型にしたプライマーの5'から3'方向への伸張反応を行う。そして、第3の工程により、これらのプライマーの伸張量を検出する。これにより、複数の領域に配置されたそれぞれのプライマーの伸張量すなわちプライマーと被検核酸の結合位置が判明し、また、各領域内のプライマーの種類は異なっているので、プライマーの塩基配列をいわゆる一筆書きのアルゴリズムを用いて解析すれば、被検核酸の塩基配列を決定することが可能である。

【0012】また、このような、複数の領域はガラス製もしくはシリコン製の材料から構成されるキャピラリープレートのコラムによって規定されることとすれば、コラムは分離されて互いに独立であるので、別の領域に配置されたプライマー同士が混ざり合うことがない。このようなキャピラリープレート形状としては、被検核酸のシーケンシングの観点からはコラムがマトリックス状に配列しており、方形のものが有用であるが、本発明ではこの形状として円形や三角形のものでも適用されうる。また、このようなキャピラリープレートのコラムは、一般的には直径数ないし数百 $\mu\text{m}$ 程度の円筒穴で規定されるので、コラム内にプライマーや被検核酸などの液体を導入する際には、表面張力を考慮してキャピラリープレートの厚み方向への電気泳動を用いることが望ましい。さらに、被検核酸のシーケンシングの観点からはプライマーはキャピラリープレートのコラム内に固定されるほうが望ましい。

【0013】また、このような伸張量の検出方法には、様々なものが考えられるが、例えば、上記第3の工程におけるプライマーの伸張量を、第2の工程における伸張反応に伴って複数種類のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体から遊離したピロリン酸をAPSと反応させてATPを生成し、このATPのルシフェラーゼ反応に伴う発光量を検出することにより行うこととしてもよい。これにより、発光量は伸張量に比例するので、伸張した長さでプライマーと被検核酸との結合位置を求めることが可能である。

【0014】また、第2の工程において複数種類のヌクレオチド類似体として蛍光ラベルしたデオキシリボヌク

レオチド三リン酸 (dNTP) を加えて被検核酸を鋳型にしたプライマーの伸張反応を行い、第3の工程におけるプライマーの伸張量を、複数の領域に励起光を照射して、伸張したプライマーの蛍光ラベルからの発光量を検出することにより行うこととしてもよい。これにより、励起光の照射により、各複合体から観測される発光量は伸張量に比例するので、伸張した長さでプライマーと被検核酸との結合位置を求めることが可能である。

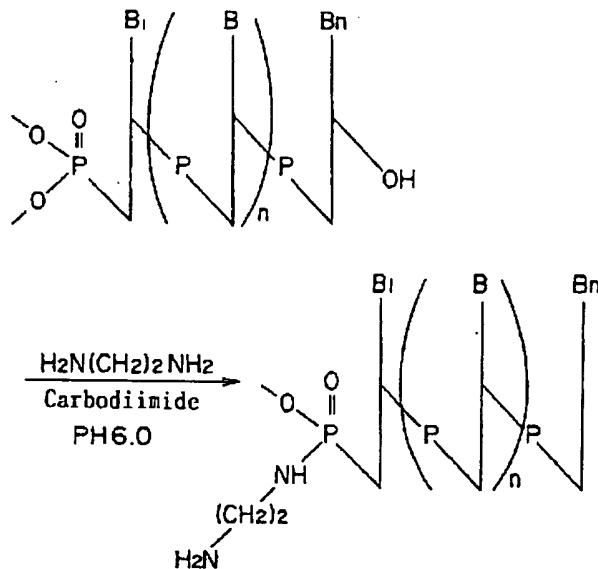
【0015】

【実施例】

(第1実施例)

(1) まず、図1に示すような複数のコラムを有する方形板のガラス製キャピラリープレートCAを容易し、SBH/SHOM法と同様にプライマーとして全てのk塩基(同図内ではA, T, G, Cの全ての組み合わせの3mer、すなわち、64コラム)の配列を含むオリゴヌクレオチドを各コラム内に固定する。

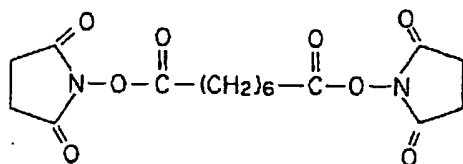
【0016】(a) これらのオリゴマーは、例えば、アプライド バイオシステム社製の381A型機などの自動合成機を用いて作製することができる。



【0022】③しかる後、アミノ ( $-NH_2$ ) 基に共有結合するバイファンクショナルクロスリンカー [例えば、ジサクシニミディル サベラート (disuccinimidyl suberate)]

【0023】

【化2】



【0024】もしくはこれの水溶性同族体ビスサルファ

【0017】(b) そしてこのようにして合成したプライマーの固定は、以下のようにして行することができる。

【0018】①各コラム内にアミノ ( $-NH_2$ ) 基を固定する。この固定には、まず、キャピラリープレートCAのコラム以外の部分にマスクを施し、このマスクを形成したキャピラリープレートCAをデシケター等の密閉容器内に設置する。しかる後、該密閉容器内にアミノプロピルトリメトキシシランをガス化して充填させ、数時間放置する。続いて、このキャピラリープレートCAをオープン (ベーク炉) で160℃程度でベークする。

【0019】②次に自動合成装置で合成したプライマーの5'端にアミノ ( $-NH_2$ ) 基を付ける。これは、プライマーに  $H_2N(CH_2)_2NH_2$  とカーボジイミド (carbodiimide) (pH6) とを反応させることにより5'端に  $NH-(CH_2)_2-NH_2$  を固定することができる。

【0020】すなわち、この反応は以下の反応式に従う。

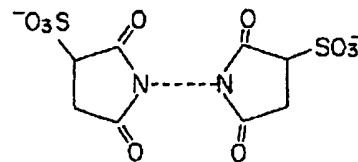
【0021】

【化1】

クシニミディル サベラート (bis-sulfosuccinimidyl suberate)]

【0025】

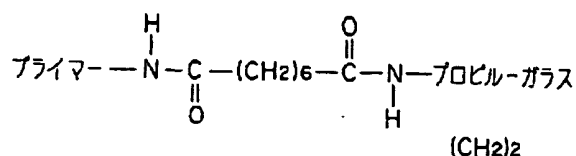
【化3】



【0026】をこれに加えると

【0027】

【化4】



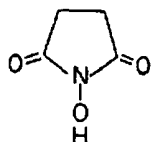
【0028】が生成される。

【0029】但し、このような反応を用いた場合にはプライマー同士が結合する恐れがあるので、アミノプロピルトリメキシランにCOOH基を付けるかまたはコラム（ガラス）に固定されたアミノ基にCOOH基を付けて、ガラス-COOH基を上述のようにサクシニミдил化する。

【0030】ここで、N-ハイドロキシサクシニミдил

【0031】

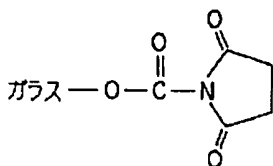
【化5】



【0032】で活性化すると、

【0033】

【化6】

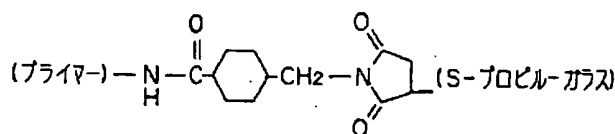
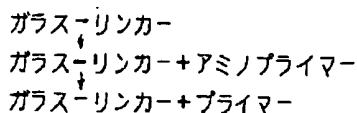


【0034】が生成される。これに②で得られたアミノ化プライマーを混ぜるとこれらがクロスリンクする。

【0035】また、バイファンクショナルクロスリンカーとアミノプライマーに時間差をつけて加える（すなわち、ガラス-リンカーにまずアミノプライマーを加える）ことによりガラス（リンカー）-プライマーを得ることができる。すなわち、

【0036】

【化7】



【0047】のように固定化される。

【0048】なお、図1のキャピラリープレートCAのコラムでは、図2に示すオリゴヌクレオチド組成でプ

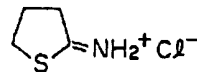
【0037】として効率よくガラスにプライマーを固定することができる。

【0038】さらに、下記①～③の手順を用いて効率よくプライマーを各コラムの（-SH基）に固定することもできる。

【0039】①まず、全コラム表面でメルカプトプロピルトリメトキシランを反応させ、（-SH基）を固定する。なお、この固定は前記のコラム-アミノ基にTrautの試薬

【0040】

【化8】

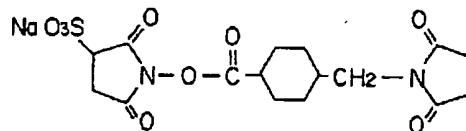


【0041】を作用させて（-SH基）を付加することもできる。

【0042】②次に、前記と同様の方法であらかじめ各プライマーの5'端にアミノ基を付加し、そこにバイファンクショナルクロスリンカーである（sulfosuccinimidy-4-（N-maleimido methyl）cyclohexane-1-carboxylate（sulf-SMCC）を共有結合させておく（pH7）。なおこの構造式は、

【0043】

【化9】



【0044】である。

【0045】③このようにして活性化させたプライマーは（-SH基）と反応して共有結合するので、各コラムに別々のプライマーを導入するとすると（pH6）、

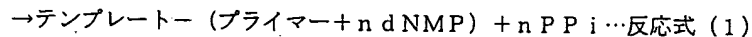
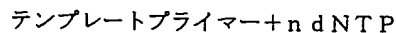
【0046】

【化10】

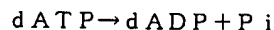
イマーが配列しているものとし、プライマーのコラム内への注入は、注入する液体（プライマー）の表面張力を考慮して、コラム内に自動合成装置からのプライマー注

入針を嵌通させるとともに、キャピラリープレートCAの厚み方向に電界を生ぜしめて電気泳動により行う。上記の順に従った結果、図1中、一部抜き出し、拡大して模式的に示すようにコラム内にオリゴヌクレオチドが固定されることになる(同図中では、プライマーは[CC])。

【0049】(2)そして、このようにしてプライマーが各コラム内に固定されたキャピラリープレートCAの各コラム内(例えば、[GAC]のコラム)に未知の一本鎖被検核酸(例えば、塩基配列が[AGCTGCTA]とする。)を加える(図3(b))。これにより、各コラム内のプライマーは被検核酸とハイブリダイズ(交雑)する。その後、交雑しなかった被検核酸は洗浄して洗い流す。そして、コラム内には、以下のポリメラーゼ反応およびルシフェラーゼ反応が円滑に行われるように、緩衝液を導入しておく(図3(c))。この緩衝液としては、シーケンスバッファーとしてのグリセロール、グルコース、APS、ルシフェリン、pH緩衝液としてのトリス塩酸等、ポリメラーゼ反応やルシフェラーゼ反応の基質となる錯体(dNTP、ATPと $Mg^{2+}$ の錯体)を生成するための $MgCl_2$ 、反応の活性化を



(4)なお、ルシフェラーゼによる発光反応の基質はルシフェリンとATPと酵素であるが、測定系に含まれているdATP及びAPSも基質となり、若干発光反応をするので測定精度を高めるためにこれらの物質は発光反応を行う前に酵素的に除く必要がある。すなわち、これらのコラムにヘキサナーゼ(具体的にはヘキサナーゼ固定化ビーズ)を加えることにより、(1)式の形成過程

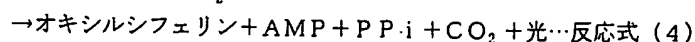
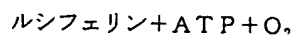


(5)次に、各コラムにATPスルフィラーゼを加えることにより、コラム内のPPiを以下の反応式(3)に従ってAPSと反応させてATPとする(図3



なお、コラム内に残留したAPSは、コラムにAPスルファターゼを加えて分解する。

【0056】(6)この後、キャピラリープレートCAを図4に示すような核酸塩基配列決定装置の暗箱DB内に配置する。なお、図4に示す核酸塩基配列決定装置は、キャピラリープレートCAを収納し、外部からの光を遮断する暗箱DBと、暗箱DBの側面に設けられてキャピラリープレートCAのコラム内を観察できる顕微鏡もしくはマイクロレンズ20と、顕微鏡もしくはマイクロレンズ20から観察されるキャピラリープレートCAを撮像するCCDテレビカメラ10と、このCCDカメラ10からのビデオ信号を画像処理する(例えば、関



すなわち、ここでのATPの量は被検核酸から遊離した

高めかつ安定性を向上させるための塩溶液としてNaCl等、酵素タンパク質を酸化変性から保護するためのディチオスレイトール等を用いる。

【0050】(3)これらの被検核酸がプライマーと交雑した各コラムに4種類のdNTP(すなわち、dATP、dTTP、dGTP、dCTP)をDNAポリメラーゼを触媒として同時に加える(図3(d))。これにより、プライマーの5'から3'方向には、被検核酸の各塩基(A;アデニン、T;チミン、G;グアニン、C;シトシン)に相補的な塩基が被検核酸の塩基とハイブリダイズし、プライマーの一方伸張反応が生じる(模式的には図3(b)に示す)。

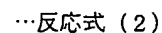
【0051】ここで、被検核酸(例えば、[AGCTGTCA])は、[TGC]、[CGA]、[GAC]、[ACG]、[GAT]のプライマーと交雑しているので、[TGC]の固定されたコラムでは、伸張反応に伴って以下の反応式(1)に従って5のピロリン酸(PPi)が遊離し、[CGA]、[GAC]、[ACG]、[GAT]のコラムではそれぞれ $n=2, 5, 3, 2, 0$ のPPiが遊離する。

【0052】

で残った余分なdATPからPiを遊離させてdADPにする(図3(e))。

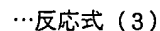
【0053】各コラムにグリセロキナーゼ(具体的にはグリセロキナーゼ固定化ビーズ)を加えることにより、以下の反応式(2)に従ってコラム内に残留しているdATPからPiが遊離する。

【0054】



(f))。

【0055】



値以下の強度の背景光信号をフィルタを通すことにより除去する)画像処理装置30と、画像処理装置30からの信号に基づいて、一筆書きのアルゴリズムにより被検核酸の配列を決定するコンピュータ40とから構成されている。このような核酸塩基配列決定装置内にキャピラリープレートCAを配置した後、コラムにルシフェラーゼ(具体的にはルシフェラーゼ固定化ビーズ)を加えることにより(図3(g))、以下の(ルシフェラーゼ反応)反応式(4)に従ってATPの量に比例した発光が得られる(図3(h))。

【0057】

PPiの量に比例し、PPiの量は伸張反応した塩基の

量に比例し、プライマーは5'端から3'端方向にしか伸張しないので、被検核酸とプライマーとのハイブリダイズの有無および被検核酸とプライマーとの結合位置が分かる。図4に示した核酸塩基配列決定装置により、このキャピラリープレートCAを観察すれば、図5(a)に示すような発光現象が観察される。なお、キャピラリープレートCAのコラム内のプライマーも配列は、前述のように、図2に示した通りである。

【0058】すなわち、[TGC]、[CGA]、[GAC]、[ACG]、[GAT]コラムでは、それぞれ発光量5、2、5、3、2、0の発光が観察されるので、これらを一筆書きのアルゴリズムに従って発光量の少ない順に並べるとTCGACGATというプライマーに伸張した塩基配列が決定される。そして被検核酸はこれに相補的な核酸であるので、被検核酸は[AGCTGCTA]と同定できる(図5(b))。

【0059】このように、測定したプライマーの長さを基にすれば、測定精度の範囲内において、それぞれのオリゴヌクレオチドの相互の位置関係が求められる。測定精度が向上してk塩基以下の差が検出できれば、図6に示すように、この段階で被検核酸の塩基配列が決定できる。同図は被検核酸として、

3'-GCCACCTCGAGGTTAAGCGGGA  
TATCACTCAGCATAATCGCCGCGAG  
TGACCGGCAGCAAAATGTT-5'

を用い、コラム内に8merのプライマーを用いた場合のハイブリダイゼーションの仕方とこのプライマー伸張反応により生じたピロリン酸の遊離量を測定することにより被検核酸の塩基配列方法を表している。このように、本実施例の方法によれば、被検核酸が長鎖になった場合でもコラム内のプライマーの長さを長くすることにより、短時間に核酸塩基の配列を決定することができるばかりでなく、この核酸塩基配列決定方法を用いれば、プライマーの種類ばかりでなくこれと鋳型の被検核酸との結合位置を測定することが可能であるので、結合位置が特定できないために決定できなかった一筆書きのオリゴ道が2つ以上ある核酸塩基の配列をある程度決定することが可能である。

【0060】測定精度の誤差限界がk塩基以上ある場合には、決定できない部分において上記SBH法で述べられている計算アルゴリズムによりもとめればよい。また、精密かつ簡単に測定を行うためには(例えば、8merの)オリゴヌクレオチドまたは被検核酸を計測器にセットできる程度の大きさのマトリックス状に固定するかもしれないコンパートメント化して(例えば、65536通りの)交雑、伸張、計測ができるようにする必要がある。また、被検核酸もしくはオリゴヌクレオチドを管壁に固定化すると伸張反応操作は簡単になる。

【0061】次に、コラム内で実際に4種類のdNTP(すなわち、dATP、dTTP、dGTP、dCT

P)をDNAポリメラーゼを触媒として導入し、4種類のdNTPを略同時被検核酸に加えることによってハイブリダイゼーションとこれに伴うピロリン酸の遊離およびピロリン酸の遊離に起因する被検核酸とプライマーとの結合位置に比例した発光が起こるかどうかを以下の実験により確かめた。

【0062】(実験例1)上記のDNAポリメラーゼによる伸張反応では1個のdNTPがDNAに取り込まれると1個のピロリン酸が遊離する。従って、伸張反応の量は遊離してくるピロリン酸の量を定量すれば求められる。実際の塩基配列決定装置に用いられる例えば百万のコンパートメントを持つキャピラリープレートは百万の試験管を束ねたものと同等であるので、ここでは3本の試験管を上記の発明を実証する実験を行い、被検核酸から遊離するピロリン酸に起因する発光量を検出した。なお、プライマーの固定は発光の現象とは無関係であるので行わなかった。ここで、ピロリン酸の量はアデノシン5'ホスホ硫酸(APS)とATPサルフリラーゼを用いてATPの量に置き換えてルシフェラーゼによる発光反応で検出した。

【0063】(材料と方法)

#### 試薬

グリセロキナーゼ固定化セファロスビーズ

ヘキソキナーゼ固定化セファロスビーズ

ATPサルフリラーゼ固定化セファロスビーズ

APサルファターゼ固定化セファロスビーズ

ルシフェラーゼ固定化セファロスビーズ

224塩基長1本鎖DNA(プラスミドのマルチクロニグサイト)

リバースプライマー

KSプライマー

DNAポリメラーゼ

dNTP緩衝液(dATP・dTTP・dGTP・dCTP各25μM、グルコース・グリセロール各10mM、APS1μM、ルシフェリン100μg/ml、40mM-トリス・塩酸(pH7.5)、20mM-MgCl<sub>2</sub>、50mM-NaCl、10mM-ディチオスレイトール)

ここで、リバースプライマーとしての塩基配列は、

[5'-AACAGCTATGACCATG-3']

をであり、KSプライマーの塩基配列は、

[5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3']  
をである。

【0064】そして、被検核酸の塩基配列としては、

[3'-TTGTCGATACTGGTACTAATG  
CGGTTTCGCGCGTTAATTGGGAGTGA  
TTTCCCTTGTTTTTCGACCCATGGCC  
CGGGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAG  
CTATTTCGAACCTATAGCTTAAGGACG  
TCGGGCCCCCTAGGTGATCAAGATC



TCGCCGGCGGTGGCGCCACCTCGAG  
GTTAAGCGGGATATCACTCAGCATA  
ATGCGCGCGAGTGACCGGCAGCAAA  
ATG-5']

を用いた。

#### 【0065】実験器具

恒温槽

試験管用測定ホルダー付き光電子増倍管型積分球

ユニバーサルホトンカウンター

実験操作

まず、試験管(a~c)を3本用意してそれぞれに以下のものを加えた。

【0066】a) dNTP緩衝液(100μl)

b) dNTP緩衝液(100μl)、1本鎖DNA(2ピコモル)、KSプライマー(1ピコモル)

c) dNTP緩衝液(1ml)、1本鎖DNA(2ピコモル)、リバースプライマー(1ピコモル)

そして、それぞれの試験管を65℃、3分間インキュベート後直ちに氷上で冷却後DNAポリメラーゼ(3ユニット)を加えて37℃、5分間インキュベートし氷上で保存した。

【0067】それぞれの試験管に以下の(1~4)の順序で酵素固定化セファロースビーズ懸濁液10μlを加えて静かに攪拌して25℃、3分間インキュベート後、上澄を新しい試験管に移し替えた。

【0068】1. グリセロキナーゼ固定化セファロースビーズ

2. ヘキソナーゼ固定化セファロースビーズ

3. ATPスルフィラーゼ固定化セファロースビーズ

4. APスルファターゼ固定化セファロースビーズ

最後のの上澄にルシフェラーゼ固定化ビーズを10μl加えて静かに攪拌した後直ちに積分球にセットして発光量をカウントした。発光量を測定した結果、プライマーの入っていない試験管(a)からは、 $2.04 \times 10^7$ 個の光電子パルスが計測され、リバースプライマーの入っている試験管(b)では $2.06 \times 10^7$ 個の光電子パルスが計測され、KSプライマーの入っている試験管(c)では $1.45 \times 10^7$ 個の光電子パルスが計測された。

【0069】すなわち、上記被検核酸とのハイブリダイゼーションによりリバースおよびKSプライマーが伸張する長さは夫々208、127であることが被検核酸の塩基配列から期待される。よって、このハイブリダイゼーションに伴うピロリン酸の遊離量はそれぞれ208、および127であると考えられ、上記の実験結果は約13塩基数の誤差で伸張した夫々のプライマーの長さを見積もれることを示している。この約13塩基数の誤差は、バックグラウンド発光によるものと考えられるので、更にバックグラウンド発光を抑える工夫をして、測定装置に改良を加えれば検出精度は改善されるものと思

われる。すなわち、この核酸塩基配列決定方法を用いれば、短時間に結合するプライマーの種類を決定できるばかりでなく、これと鑄型である被検核酸との結合位置を測定することが可能であるので、結合位置が特定できないために決定できなかった一筆書きのオイラー道が2つ以上ある核酸塩基の配列をもある程度決定することが可能である。

【0070】(第2実施例) 上述の第1実施例では、プライマーと被検核酸をハイブリダイゼーションさせて、このハイブリダイゼーションにより遊離したピロリン酸の量を定量することにより、被検核酸の塩基配列を決定することができた。次に、蛍光ラベル体dNTPを用いて核酸塩基配列を決定する方法について説明する。

【0071】(1) まず、第1実施例と同様にして、図1に示すような複数のコラムを有する方形板のガラス製キャピラリープレートCAにプライマーとして全てのk塩基(同図内ではATGCの全ての組み合わせの3mer、すなわち、64コラム)の配列を含むオリゴヌクレオチドを各コラム内に固定する(図7(a))。

【0072】(2) そして、このようにしてプライマーが各コラム内に固定されたキャピラリープレートCAの各コラム内(例えば、[GAC]のコラム)に未知の一本鎖被検核酸(例えば、塩基配列が[ATCTGCTA]とする。)を加える(図7(b))。これにより、各コラム内のプライマーは被検核酸とハイブリダイズ(交雑)する。その後、交雑しなかった被検核酸は洗浄して洗い流す。そして、コラム内には、以下のポリメラーゼ反応およびルシフェラーゼ反応が円滑に行われるように、緩衝液を導入しておく(図7(c))。この緩衝液としては、第1実施例のものと同様とする。

【0073】(3) これらの被検核酸がプライマーと重合した各コラムに4種類の蛍光-dNTP(すなわち、dATP、dTTP、dGTP、dCTP)をDNAポリメラーゼを触媒として同時に加える(図7(d))。これにより、プライマーの5'から3'方向には、被検核酸の各塩基(A; アデニン、T; チミン、G; グアニン、C; シトシン)に相補的な塩基が被検核酸の塩基とハイブリダイズし、プライマーの一方方向伸張反応が生じる(模式的には図7(b)に示す)。この後、蛍光-dNTPは洗浄によりコラム内から除去しておく。

【0074】ここで、被検核酸(例えば、[AGCTGTCA])は、[TGC]、[CGA]、[GAC]、[ACG]、[GAT]のプライマーと重合しているので、[TGC]の固定されたコラムでは、伸張反応に伴って以下の反応式(1)に従ってn=5の蛍光色素が取り込まれるとともに、[CGA]、[GAC]、[ACG]、[CGA]、[GAT]のコラムではそれぞれn=2、5、3、2、0の蛍光色素が取り込まれる。

【0075】(4) この後、キャピラリープレートCAを図8に示すような核酸塩基配列決定装置の暗箱DB内

に配置する。図8に示す核酸塩基配列決定装置は、キャピラリープレートCAを収納し、外部からの光を遮断する暗箱DB1と、このキャピラリープレートCAに励起光を照射する励起光源（例えば、キセノンランプ）70と、暗箱DB1の一側面に設けられてキャピラリープレートCAのコラムを撮像するCCDテレビカメラ10とを備えている。また、励起光源70とキャピラリープレートCAとの間には励起光透過フィルタ50が設けられており、これを透過する光の波長成分のうち、短波長（例えば、ピーク値450nm）のみを同図（c）に示すように透過させてキャピラリープレートCAに照射する構成となっている。また、キャピラリープレートCAとCCDテレビカメラ10との間には、蛍光透過フィルタ60が設置されており、同図（b）に示すように蛍光波長（例えば、500nm）以上の光を透過させる。なお、励起光源70としては、同図（d）に示すような超高压水銀ランプ701を用いてもよい。

【0076】（5）このような核酸塩基配列決定装置内にキャピラリープレートCAを配置した後、励起光源70からの励起光（例えば、波長450nm）をキャピラリープレートCAに照射し、蛍光像を観察する。この観察によって得られる蛍光像は、図5（a）と同様であり、第1実施例と同様にして被検核酸の配列を決定することができる。すなわち、ここでのプライマーの伸張量は蛍光色素からの蛍光量に比例し、プライマーは5'端から3'端方向にしか伸張しないので、被検核酸とプライマーとのハイブリダイズの有無および被検核酸とプライマーとの結合位置が分かる。なお、キャピラリープレートCAのコラム内のプライマーも配列は、前述のように、図2に示した通りである。

【0077】すなわち、[TGC]、[CGA]、[GAC]、[ACG]、[GAT]コラムでは、それぞれ発光量5、2、5、3、2、0の蛍光が観察されるので、これらを一筆書きのアルゴリズムに従って発光量の少ない順に並べるとTCGACGATというプライマーに伸張した塩基配列が決定される。そして被検核酸はこれに相補的な核酸であるので、被検核酸は[AGCTGCTA]と同定できる（図5（b））。また、この方法によっても図6に示されるような長鎖の被検核酸の塩基配列を決定することも可能である。

【0078】次に、コラム内で実際に4種類の蛍光色素-dNTP（すなわち、-dATP、-dTTP、-dGTP、-dCTP）をDNAポリメラーゼを触媒として導入し、4種類の蛍光色素-dNTPを略同時に被検核酸に加えることによってハイブリダイゼーションが生じ、被検核酸とプライマーとの結合位置に比例した蛍光（発光）が観察されるかどうかを以下の実験により確かめた。

【0079】（実験例2）伸張反応に伴い取り込まれるdNTPの定量を行った。DNAポリメラーゼによる伸

張反応でdNTPをDNAに取り込ませるときに一部もしくは全部のdNTPの代わりに蛍光色素-dNTPに用いる。dTTPと互換性のあるフルオレッセイン-12-dUTP（もしくはローダミン-4-dUTP）を一部用いたところ伸張反応が起こった。この場合、未反応の蛍光ラベルdNTPを洗浄により除くために交雑している核酸は管壁等に固定化しておく必要がある。ここでは、代替操作として磁気ビーズに固定化して洗浄を行った。

#### 【0080】（材料と方法）

##### 試薬

ストレプトアビジン固定化磁気ビーズ（Dynabeads M-280）

3'末端がビオチン化された224塩基長1本鎖DNA（プラスミドのマルチクローニングサイト）

リバースプライマー

KSプライマー

DNAポリメラーゼ（AmpliTaq™ DNA polymerase）

dNTP緩衝液（dATP・dGTP・dCTP各25μM、dTTP8μM、フルオレッセイン-12-dUTP（もしくはローダミン-4-dUTP）2μM、10mM-トリス・塩基（pH8.3）、1.5mM-MgCl<sub>2</sub>、50mM-KCl、0.01%ゼラチン）

洗浄液（10mM-トリス・塩基（pH7.5）、2mM-EDTA、1M-NaCl）

80%ホルムアミド水溶液

##### 実験器具

磁石付き試験管ホルダー

PCR用恒温槽

蛍光分光光度計

##### 実験操作

まず、2つの試験管（a、b）を用意しておき、夫々に以下のものを加えた。

【0081】a）dNTP緩衝液（50μl）、1本鎖DNA（1ピコモル）、DNAポリメラーゼ（1ユニット）、リバースプライマー（2ピコモル）

b）dNTP緩衝液（50μl）、1本鎖DNA（1ピコモル）、DNAポリメラーゼ（1ユニット）、KSプライマー（2ピコモル）

次に、夫々を95℃（30秒）、41℃（30秒）、72℃（5分）、の順序でインキュベートした。その後、直ちに4℃に保った。

【0082】しかる後、磁気ビーズ（50μl）を加えて攪拌し磁石付きホルダーにセットする。磁気ビーズに接触しないようにしてピペットで上澄を捨て洗浄液で2回、蒸留水で1回磁気ビーズを洗浄した。そして、磁気ビーズを500μlの80%ホルムアミド水溶液に懸濁し95℃で3分間インキュベートし、伸張した相補鎖を溶出した。

【0083】次に、磁石付きのホルダーに再びセットし、今度は伸張相補鎖を含んでいる上澄み液を分光光度計のキュベットにとり、蛍光スペクトルを測る。励起光はフルオレッセインの場合488nm、ローダミンの場合540nmを用いた。フルオレッセインおよびローダミンを取り込んだDNAの蛍光スペクトルを図9に示す。また、夫々の蛍光色素を用いた伸張反応の長さの計測には520nmおよび580nmにおける蛍光強度を用いた。また、これらの蛍光強度（発光量）を測定した結果、フルオレッセインの蛍光色素を用いた場合には、リバースプライマーの入っている試験管（a）では3.35（a. u.）の蛍光強度が観測され、KSプライマーの入っている試験管（b）では1.71（a. u.）の蛍光強度が観測された。また、ローダミンの蛍光色素を用いた場合には、リバースプライマーの入っている試験管（a）では10.10（a. u.）の蛍光強度が観測され、KSプライマーの入っている試験管（b）では5.26（a. u.）の蛍光強度が観測された。

【0084】2つの伸張反応の蛍光強度比はいずれも1.9程度となった。実際に伸張した長さ（塩基数）の比は208/127=1.63であるが、取り込まれるべき蛍光色素-dUTP（すなわちTの位置）の数の比を計算すると、1.96となり、蛍光強度の実測値と非常に近い値となっていることがわかる。

【0085】すなわち、上記被検核酸とのハイブリダイゼーションによりリバースおよびKSプライマーが伸張する長さの比率は1種類の蛍光色素-dNTPを用いた時でもある程度蛍光強度から決定することが可能であり、プライマーと被検核酸との結合位置と結合したプライマーの種類とが判明するので、これにより、一筆書きのアルゴリズムを用いれば、第1実施例と同様に被検核酸の塩基配列を決定することができた。また、計測精度をさらに向上させることにより、プライマーの種類ばかりでなくこれと鋳型の被検核酸との結合位置を精密に測定することが可能であるので、結合位置が特定できないために決定できなかった一筆書きのオイラー道が2つ以上ある核酸塩基の配列をも決定することが可能である。

【0086】なお、本発明は、上記実施例に限定されるものではない。すなわち、上記第1および第2実施例では、（ア）遊離したピロリン酸の量を測定したり、

（イ）蛍光ラベルからの発光を観測したりして伸張した長さを求めたが、この伸張した長さを求める方法としては以下のようなものが挙げられる。

【0087】（ア）伸張反応に伴い遊離してくる分解産物の量を測定する。

【0088】（イ）伸張反応に伴い核酸中に取り込まれる塩基の量を測定する。

【0089】（ウ）伸張反応後の被検核酸を原子レベルの分解能を持つ電子顕微鏡やトンネル顕微鏡などで直接2重鎖の部分長さを観測する。

【0090】（エ）伸張反応の産物そのもの（相補鎖核酸）を分離して現在実用化されている方法と同様にゲル電気泳動にかけて長さを求めることも可能である。

【0091】また、上記第1および第2実施例ではマトリックス状にプライマーを配置しやすいので、方形のキャピラリープレートCAを用いたが、これは円形のものを用いてもよい。

【0092】

【発明の効果】以上の通り、本発明に係る核酸塩基配列決定方法によれば、まず、第1の工程により、プライマーと被検核酸とをハイブリダイゼーションさせてこれらの複合体を形成し、次に、第2の工程により被検核酸を鋳型としてプライマーの5'から3'方向への伸張反応を行い、第3の工程によりプライマーの伸張量を検出する。これにより、短時間に複数の領域に配置されたそれぞれのプライマーの伸張量すなわちプライマーと被検核酸の結合位置と各領域内の結合したプライマーの種類を知ることができるので、プライマーの塩基配列をいわゆる一筆書きのアルゴリズムを用いて解析すれば、被検核酸の塩基配列を決定することが可能である。

【0093】さらに、計測精度をさらに向上させることにより、プライマーの種類ばかりでなくこれと鋳型の被検核酸との結合位置を精密に測定することが可能であるので、結合位置が特定できないために決定できなかった一筆書きのオイラー道が2つ以上ある核酸塩基の配列をも決定することが可能である。また、このような、複数の領域はガラス製もしくはシリコン製の材料から構成されるキャピラリープレートのコラムによって規定されることとすれば、プライマー同士が混ざり合うことがない。

【0094】このような伸張量の検出方法には、伸張反応に伴って複数種類のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体から遊離したピロリン酸に起因するATPのルシフェラーゼ反応に伴う発光量を検出することにより行うこととしてもよいし、ヌクレオチド類似体として蛍光ラベルしたデオキシリボヌクレオチド三リン酸（dNTP）を加えて被検核酸を鋳型にしたプライマーの伸張反応を行い、これからの発光量を検出することにより行うこととしてもよい。これにより、発光量は伸張量に比例するので、結合したプライマーの種類とプライマーと被検核酸との結合位置を求めることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例で用いるキャピラリープレートの斜視図である。

【図2】図1のキャピラリープレート内でのプライマーの配列を示す配列説明図である。

【図3】本発明の第1実施例の手順を説明する説明図である。

【図4】第1実施例で用いた核酸塩基配列決定装置の斜視構成図である。

【図5】図1のキャピラリープレートにおける発光と被検核酸の同定を説明するための説明図である。

【図6】長鎖の被検核酸の同定を説明するための説明図である。

【図7】本発明の第2実施例の手順を説明する説明図である。

【図8】第2実施例で用いた核酸塩基配列決定装置の斜視構成図である。

【図9】第2実施例で測定した蛍光ラベルしたDNAの

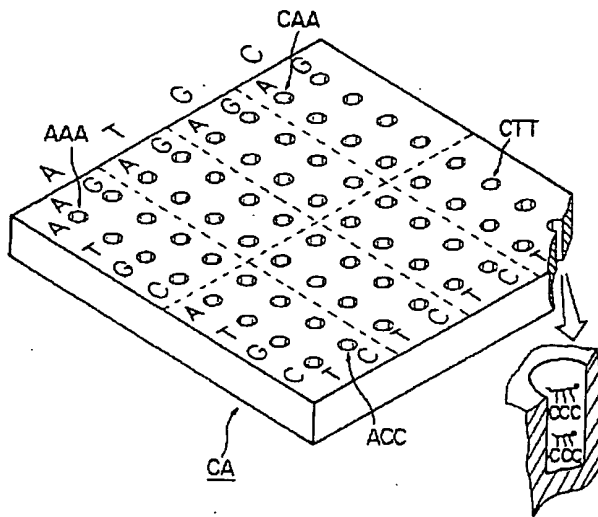
らの発光強度と波長の関係を示す図である。

【図10】従来のSBH法を説明するための説明図である。

【符号の説明】

CA…キャピラリープレート、DB、DB1…暗箱、10…CCDカメラ、20…顕微鏡、30…画像処理装置、40…コンピュータ、50…励起光透過フィルタ、60…蛍光透過フィルタ、70…励起光源、701…超高圧水銀ランプ。

【図1】

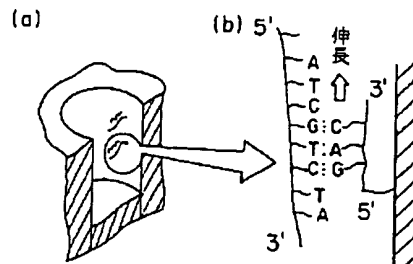


【図2】

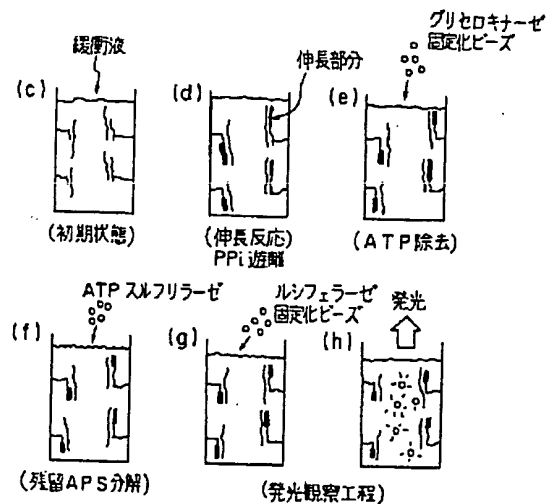
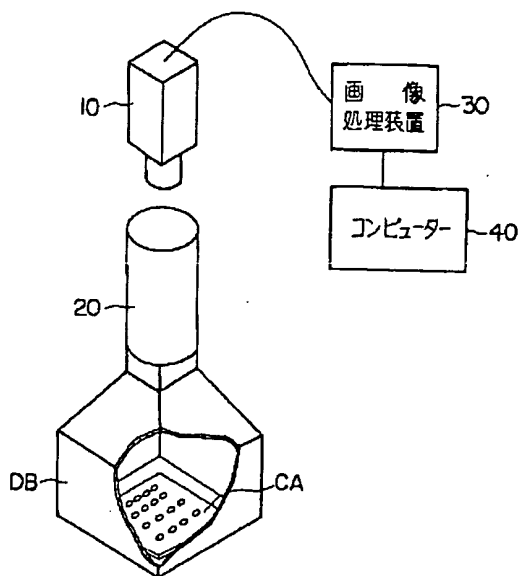
j s f	j s f	j s f	j s f	j s f	j s f	j s f	j s f
AAA	AGA	TAA	TGA	GAA	GGA	CAA	CGA
AAT	AGT	TAT	TGT	GAT	GGT	CAT	CGT
AAG	AGG	TAG	TGG	GAG	GGG	CAG	CGG
AAC	AGC	TAC	TGC	GAC	GGC	CAC	CGC
ATA	ACA	TTA	TCA	GTA	GCA	CTA	CCA
ATT	ACT	TTT	TCT	GTT	GCT	CTT	CCT
ATG	ACG	TTG	TCG	GTG	GCG	CTG	CCG
ATC	ACC	TTC	TCC	GTC	GCC	CTC	CCC

キャピラリープレート内のプライマーの配置

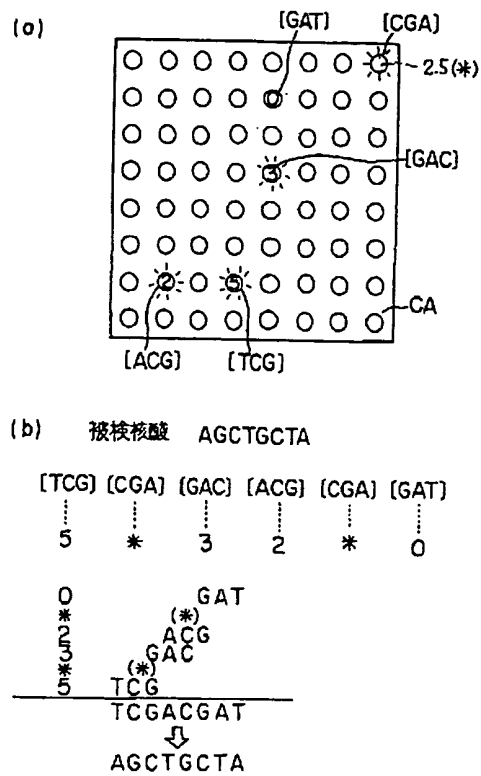
【図3】



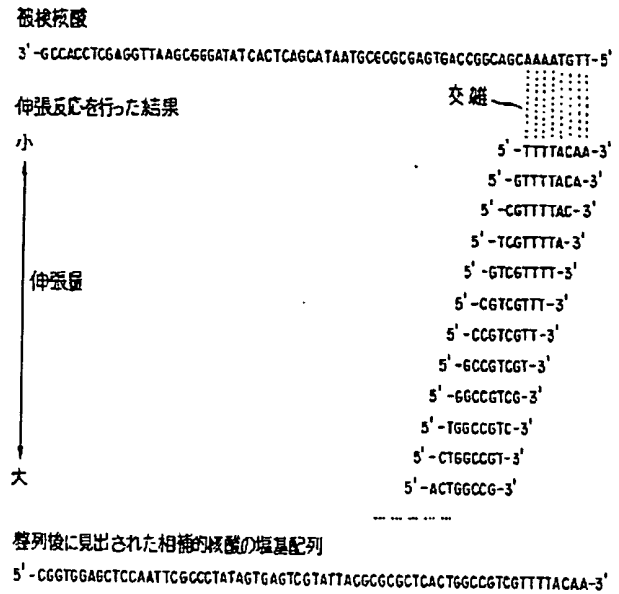
【図4】



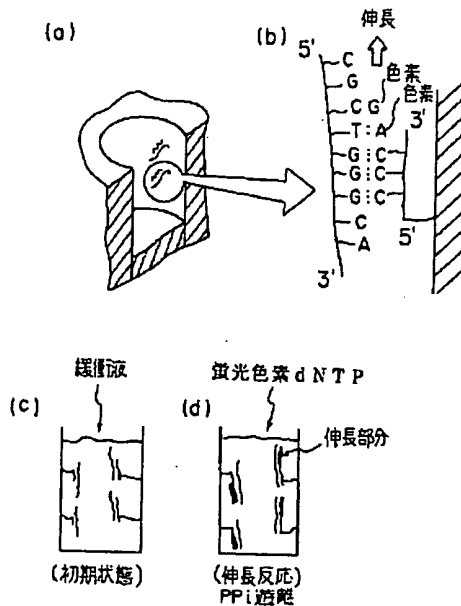
【図5】



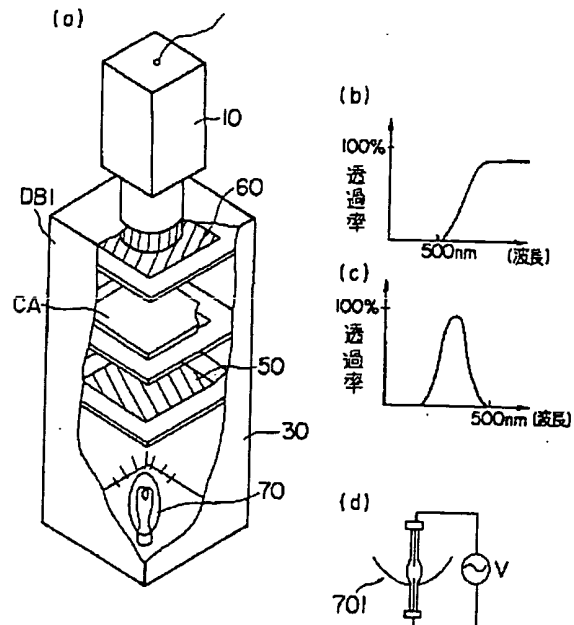
【図6】



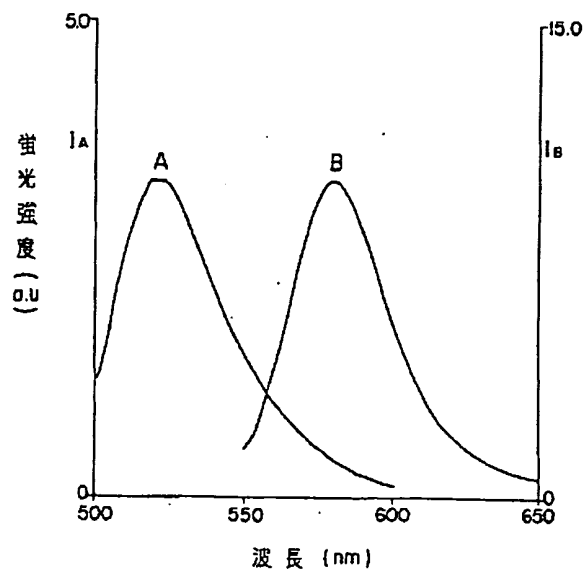
【図7】



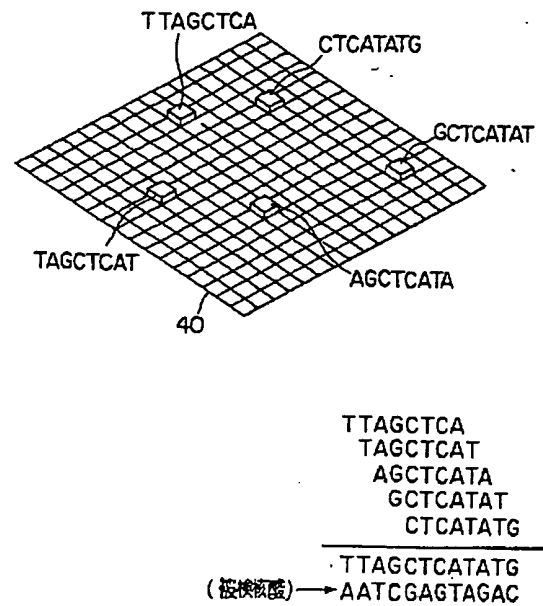
【図8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

G 0 1 N 33/50

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

P